



Licenciatura en Biotecnología

Seminario de Investigación

Hongos alcalino-tolerantes como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico

Rojas, Natalia Lorena

Dirección: Dr. Claudio E. Voget

Co-dirección: Dr. Sebastián F. Cavalitto

Marzo de 2004

Agradecimientos:

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata por darme la oportunidad de realizar mis estudios de investigación en sus instalaciones y laboratorios.

A la Dra. Marta Cabello del Instituto Spegazzini (UNLP) por su gentileza en proveernos las cepas empleadas y su asesoramiento a lo largo del trabajo.

Al Prof. Luis Bruno Blanch del Laboratorio de Química Medicinal, Departamento de Ciencias Biológicas (UNLP), buena disposición para asesorarme en el análisis en TLC y la purificación de la naringina.

A mi director de tesis Dr. Claudio E. Voget por su valiosa asesoría y su gran dedicación.

A mi co-director de tesis, el Dr. Sebastián Cavalitto, por haberme orientado y ayudado en todo el trabajo.

También agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio Carolina Vita, Rubén Oltolina., Cecilia Tangorra y Ramón Ducay.

A Diego, por contenerme siempre.

A mis papas, porque siempre confiaron en mí.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL INTRODUCCIÓN.....	3
INTRODUCCIÓN	5
1.1 LA PARED CELULAR VEGETAL	6
1.2 PECTINASAS MICROBIANAS.....	9
1.2.1 Enzimas que degradan HG.....	10
1.2.2 Enzimas que degradan ramnogalacturonano.....	12
1.2.3 Las pectinasas alcalinas.....	13
1.3 HONGOS SUBDIVISIÓN DEUTEROMYCOTINA.....	14
1.3.1 Características Generales	14
1.3.2 Gliocladium roseum Bain.....	15
1.3.3 Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.....	16
1.3.4 Penicillium lilacinum Thom.....	17
1.3.5 Acremonium sp.....	18
1.3.6 Doratomyces stemonitis (Pers ex Steud.) Morton & G.S.m.....	18
1.3.7 Verticillium tenerum (Nees ex Pers.) Link.....	19
1.3.8 Volutella ciliata Alb. & Schw. ex Fr.....	20
1.4 CULTIVOS DE HONGOS	21
1.5 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	21
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 MATERIALES	23
2.2 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS	25
2.3 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	25
2.3.1 Medios de mantenimiento y esporulación	25
2.3.2 Cultivos en medios agarizados para el estudio preliminar de crecimiento en superficie	26
2.3.3 Fermentación en sustrato sólido (FSS).....	27
2.3.4 Caracterización de la perlita.....	28
2.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA	29
2.4.1 Determinación de carbohidratos.....	29
2.4.2 Determinación de humedad.....	29
2.4.3 Determinación de proteína.....	29

2.5	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	29
2.5.1	<i>Preparación de las muestras de enzima.....</i>	29
2.5.2	<i>Actividad glicosidasa.....</i>	30
2.5.3	<i>Actividad liasa.....</i>	30
2.5.4	<i>Medidas de actividad enzimática por incremento de poder reductor.....</i>	31
2.5.5	<i>Definición de actividad enzimática:.....</i>	31
2.6	PURIFICACIÓN DE RAMNOSIDASA ALCALINA	31
2.7	TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	32
3	RESULTADOS.....	33
3.1	ESTUDIO PRELIMINAR DE CRECIMIENTO EN MEDIOS AGARIZADOS.....	33
3.2	CRECIMIENTO EN FSS.....	35
3.2.1	<i>Propiedades de hidratación de la perlita.....</i>	35
3.2.2	<i>Crecimiento fúngico en medio con perlita</i>	37
3.3	SCREENING DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	39
3.3.1	<i>Actividad pectolítica :</i>	39
3.3.2	<i>.Actividad glicosidasa</i>	43
3.3.3	<i>Hidrólisis de naringina con α- ramnosidasa alcalina de V. tenerum.</i>	46
4	CONCLUSIONES	49
5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

Introducción

Las enzimas, biocatalizadores altamente específicos y eficientes, fueron descubiertas en la segunda mitad del siglo XIX. Los avances de la biotecnología de las últimas décadas, especialmente en la genética e ingeniería de proteínas, han otorgado a las enzimas un rol fundamental dentro de los procesos industriales ¹. Actualmente existe una tendencia creciente a reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos que impliquen microorganismos y/o enzimas, ya que no sólo constituyen una alternativa menos agresiva para el medio ambiente, sino que también son económicamente más viables ². Con el propósito de que las enzimas tengan un impacto significativo sobre dichos procesos, éstas deberían ser efectivas bajo varias condiciones de trabajo. Por lo expuesto, el desarrollo de productos enzimáticos de origen microbiano usualmente recae en el screening inicial de un gran número de microorganismos adaptados a distintas condiciones ambientales a los efectos de conseguir enzimas con características físicas y bioquímicas aptas para la aplicación particular que se desea realizar. En una etapa posterior, el biocatalizador se purifica, se determinan sus propiedades más relevantes y se investiga la factibilidad técnica del proceso enzimático. Esta etapa suele complementarse con el desarrollo de técnicas de biología molecular para el clonado y sobreexpresión del gen que codifica la proteína enzimática con varios fines tales como la producción de biocatalizador en cantidad adecuada (mg/l o g/l de proteína enzimática) para ensayos en gran escala, simplificar el proceso de purificación y aumentar la actividad y estabilidad del biocatalizador (ingeniería de proteínas). Finalmente, la adopción de un nuevo proceso enzimático dependerá de varios factores, como por ejemplo el impacto en la calidad y costo del producto final y ventajas ambientales por sustitución de etapas químicas contaminantes.

El presente trabajo está relacionado con la etapa inicial del desarrollo de los procesos enzimáticos, es decir el screening de actividades enzimáticas. El objeto de estudio lo constituyen un grupo de hongos filamentosos que fueron aislados por la Dra. Marta Cabello del Instituto Spegazzini (UNLP) ³ de los suelos que constituyen

el ecosistema de los bosques de tala (*Celtis tala*) y coronillo (*Scutia buxifolia*) situados en la región costera de la Provincia de Buenos Aires (partidos de Magdalena y Punta Indio). En estos suelos con alto porcentaje de carbonato de calcio y pH entre 7.2 y 9.0, habitan especies de la microbiota fúngica con capacidad de crecer en medios altamente alcalinos (pH 9-10). Esta capacidad adaptativa hace suponer que tengan la propiedad de segregar enzimas alcalino-tolerantes o alcalino-activas, requeridas para la degradación de los sustratos presentes en el suelo. Hasta el momento no se han realizado estudios sobre qué tipo de enzimas producen estos microorganismos. Resultó por lo tanto de interés realizar un screening de actividades enzimáticas alcalinas focalizado principalmente en aquellas enzimas involucradas en la degradación de la pared celular vegetal, en particular las pectinasas, ya que las mismas presentan un potencial interés tecnológico.

Para una mejor comprensión del presente trabajo, a continuación se describe la estructura de la pared celular vegetal, las enzimas involucradas en su degradación y sus potenciales aplicaciones tecnológicas. Del mismo modo, se hace referencia a los hongos implicados en el screening enzimático y su cultivo *in vitro*.

1.1 La pared celular vegetal

Típicamente, las paredes celulares vegetales están formadas por dos capas: la pared secundaria, más interna, compuesta básicamente de fibras de celulosa y hemicelulosa; y la pared primaria, más externa, formada por las mismas fibras embebidas en sustancias pécticas (pectina) y proteínas. Las paredes primarias de dos células contiguas se hallan unidas por la laminilla media, estructura formada principalmente por sustancias pécticas, que cumple el rol de sustancia cementante.

La celulosa, que representa el componente mayoritario, consta de cadenas lineales (no ramificadas) de glucosa en uniones β -(1 \rightarrow 4). Las cadenas de celulosa están ordenadas en fibras y son las responsables de mantener la rigidez de la pared celular. La hemicelulosa es un grupo más heterogéneo de polisacáridos y el segundo en abundancia en los tejidos vegetales. Los componentes principales de este grupo

varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan. El principal constituyente de la hemicelulosa descrito en cereales y maderas duras (hardwoods) es el xilano, esqueleto de residuos de xilosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4) que pueden estar sustituidos con diferentes azúcares. La pectina es el polisacárido que presenta mayor complejidad en cuanto a composición y estructura. En esencia, la pectina está formada por dos familias de heteropolisacáridos ácidos entrelazados covalentemente: los galacturonanos y el ramnogalacturonano tipo I (*RGI*).

Los galacturonanos están formados por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GALA) unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 4). El galacturonano mejor descrito es el homogalacturonano (*HG*), que es lineal y suele estar esterificado con metanol en el C-6 y/o con acético en C-2. El grado de metoxilación es una característica muy importante, ya que le modifica a la pectina sus propiedades estructurales y funcionales. La interacción del *HG* con iones Ca^{+2} (se requieren al menos 14 residuos) produce el fenómeno de gelación, que se revela por la precipitación del polímero inducida por la unión del Ca^{+2} a los grupos carboxilo. Debido a que el *HG* no contiene esencialmente ramificaciones o cadenas laterales, esta región de la pectina es denominada *región lisa* (*smooth region*).

Otros dos galacturonanos encontrados en paredes celulares vegetales son el xilogalacturonano y el ramnogalacturonano tipo II (*RGII*). El *RGII* es sumamente complejo pues presenta ramificaciones que contienen azúcares raros. Suele encontrarse adyacente al *RGI*. Un esquema de la estructura de los galacturonanos se presenta en la Figura 1.1.

Galacturonanos: unión: $\alpha(1 \rightarrow 4)$

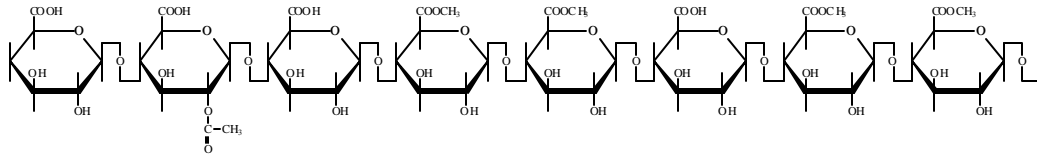
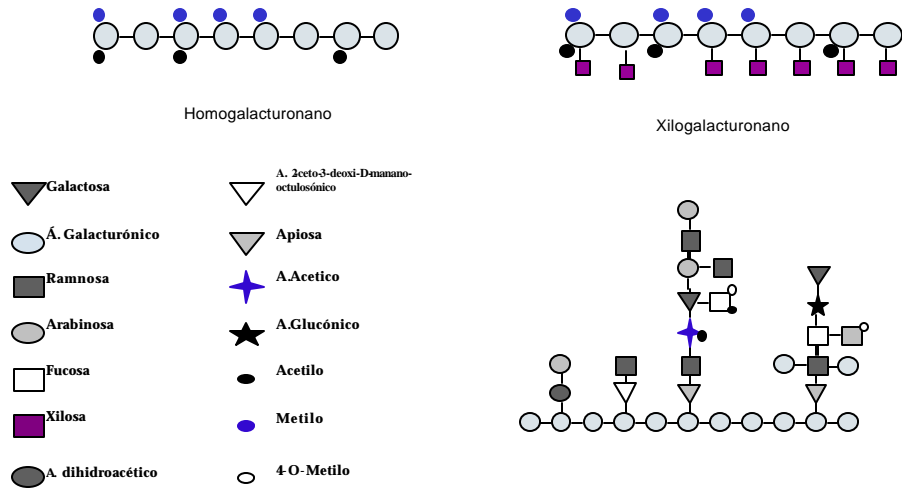


Figura 1.1 Representación esquemática de los galacturonanos que constituyen la pectina HG: El número de restos metilados y/o acetilados depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina.⁴

La otra familia de polisacáridos ácidos que forman la pectina es el RGI, compuesto de unidades repetidas del dímero (Fig. 1.2). A los residuos de ramnosa se unen azúcares neutros formando largas cadenas laterales. Los mas comunes son D-galactosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 6) y L-arabinosa unidos por enlace α -(1 \rightarrow 5). Debido a la presencia de ramificaciones, esta región se ha denominado pilosa (hairy reggion)^{6, 7}

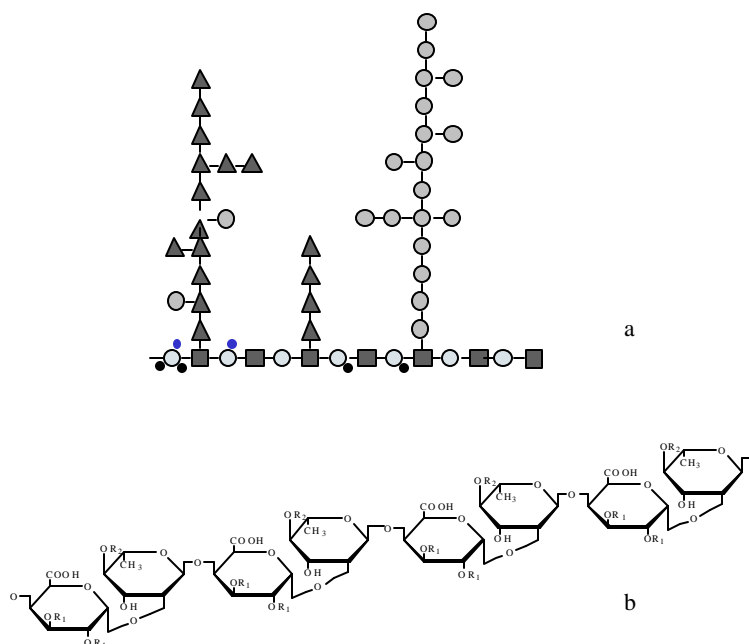


Figura 1.2 a- Representación esquemática del RGI: El significado de los símbolos es el mismo que el indicado en la Figura 1.1 **b-** Esqueleto detallado del RGI: R_1 puede ser H o grupos acetilo ($-\text{CO}-\text{CH}_3$). R_2 puede ser H o una serie de cadenas de composición y tamaño variable dependiendo de la fuente de la pectina

Las pectinas cumplen diversos roles fisiológicos en el tejido vegetal tales como el control de la porosidad de la pared o la defensa contra fitopatógenos, y son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos y farmacéutica como agentes gelificantes y estabilizantes.

1.2 Pectinasas microbianas

Las enzimas pectolíticas o pectinasas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que catalizan la ruptura de los componentes de la pectina. Éstas son producidas por una extensa variedad de organismos tales como bacterias ⁸; ⁹; ⁶, levaduras ¹⁰, hongos ¹¹ ¹², insectos, nematodos y protozoos y son generalmente inducibles.

La degradación enzimática total de la pectina resulta principalmente en GALA y ramnosa, junto a cantidades menores de galactosa, arabinosa, metanol, acetato y trazas de otros azúcares tales como xilosa, fucosa, y apiosa los cuales son metabolizados durante el crecimiento celular.

No existe un único criterio para clasificar a las enzimas que actúan sobre la pectina. Una posibilidad, es diferenciarlas según la acción que realicen sobre la misma. De esta forma se las puede agrupar en desesterificantes y depolimerizantes. Las enzimas incluidas dentro de este último grupo pueden atacar preferentemente a las zonas lisas (*HG*) o a las pilosas (*RGI*)¹³ y pueden ser divididas según (al menos) tres criterios

- ❖ Según actúen por hidrólisis o transeliminación
- ❖ Según la preferencia por el grado de esterificación del sustrato
- ❖ Según el sitio de corte, aleatoriamente dentro de la cadena (endo) o desde el extremo de la misma (exo).

A continuación se describen las enzimas pectolíticas más relevantes. Por cuestiones de claridad estas enzimas se dividirán en dos grupos, según ataquen el *HG* o *RGI*. En la figura 1.3 se muestra un esquema de la degradación enzimática de la pectina.

1.2.1 Enzimas que degradan HG

1.2.1.1 Esterasas

Pectin metil esterasa, PE (EC 3.1.1.11): hidroliza la unión metil ester.

Pectin acetil esterasa, PAE (EC 3.1.1.6): hidroliza la unión acetil ester.

1.2.1.2 Hidrolasas

Endo-poligalacturonasas, endo-PG (EC 3.2.1.15): hidroliza las uniones glicosídicas entre residuos de GALA no esterificados.^{14,15}

Exo-poligalacturonasas, exo-PG (EC 3.2.1.67): hidrolizan el HG desde el extremo no reductor.¹⁶

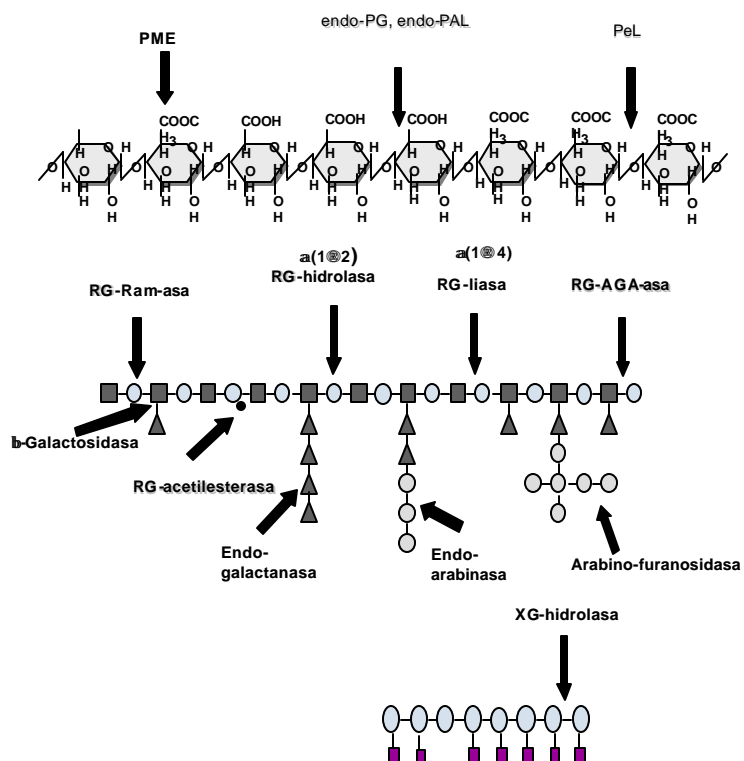


Fig. 1.3 Esquema de la degradación enzimática de pectina

Polimetilgalacturonasa (PMG):¹⁷ Esta enzima degradaría por un mecanismo endo el *HG* altamente esterificado, pero la existencia de la misma no está confirmada.

Oligogalacturonasa (OG): El sustrato principal de las mismas son oligómeros saturados, el cual es atacado por el extremo no reductor liberando monómeros de GALA.¹⁸

1.2.1.3 Liasas:

Estas enzimas, también llamadas transeliminadas, catalizan la ruptura no hidrolítica de la cadena de pectina o pectato. Rompen el enlace glicosídico en el C 4 eliminando al mismo tiempo un hidrógeno del C 5 ¹⁹. Durante la ruptura se genera un doble enlace en el extremo no reductor de la cadena resultante, fácilmente medible a 235 nm.

Pectin-liasa, PL (EC. 4.2.2.10): depolimerizan el HG altamente metilado. No requieren calcio para su actividad. Todas ellas poseen actividad endo, generando oligómeros insaturados metilados

Pectato-liasa, endo-PAL (EC 4.2.2.2); exo-PAL: A diferencia de las pectin liasa, estas enzimas actúan sobre sustratos con bajo grado de esterificación y requieren Ca^{+2} para su actividad óptima (28; 29). Pueden ser de tipo endo o exo. Su actividad genera oligogalacturonatos insaturados

Oligogalacturonato liasas (OGL): Tienen la particularidad de ser enzimas ligadas a membrana que degradan oligogalacturonatos (saturados o no) liberando monómeros insaturados desde el extremo reductor.

1.2.2 Enzimas que degradan ramnogalacturonano.

Las enzimas que degradan el *RGI* fueron aisladas y caracterizadas hace relativamente poco tiempo. Las que actúan sobre el esqueleto principal lo hacen en forma endo: Ramnogalacturonato-hidrolasa (RG-hidrolasa), que hidroliza el enlace α -D-galacturónico-(1→2)- α -L-ramnosa y Ramnogalacturonato-liasa (RG-liasa), que corta mediante transeliminación el enlace α -L-ramnosa-(1→4)- α -D-galacturónico; o en forma exo: Ramnogalacturonano ramnohidrolasa (RG ramnohidrolasa) que libera ramnosa terminal y Ramnogalacturonano galacturonohidrolasa que libera GALA desde el extremo no reductor ^{20; 21}. La acción de la RG ramnohidrolasa es específica del RGI o de oligómeros que derivan de él y es diferente de la clásica α -ramnosidasa que hidroliza el sustrato cromogénico p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pnp-Rha) y las uniones α -(1→2) y α -(1→6) entre ramnosa y

glucosa presentes en los flavonoides naringina y hesperidina respectivamente. La RG ramnoidrolasa no tiene actividad sobre estos sustratos y viceversa, es decir la ramnosidasa no actúa sobre el *RGI*. Otra enzima importante que degrada *RGI*, es la ramnogalacturonano acetilesterasa, que hidroliza el enlace ester entre restos acetilos y el O-2 y O-3 de los residuos de GALA. Este paso es indispensable en la degradación del *RGI* ya que ni la RG hidrolasa ni la RG liasa atacan al RG cuando éste posee un alto grado de esterificación.

Además de las enzimas que degradan el esqueleto principal, existe un conjunto de enzimas, denominadas accesorias, que degradan las ramificaciones del *RGI*. Algunas de ellas son: α -L-arabinofuranosidasas (hidrolizan la arabinosa terminal, acción exo), endo-arabinasas, α - y β -galactosidasas (hidrolizan la galactosa terminal, acción exo), endo -galactanasas, feruloil-esterasa y p-cumaril-esterasas. Estas enzimas son indispensables para la completa degradación y utilización de la pectina por parte de los microorganismos.

1.2.3 Las pectinasas alcalinas

Las pectinasas alcalinas son aquellas cuyo pH óptimo de actividad se encuentra entre 8.0 y 10.5. La mayoría de la pectinasas alcalinas estudiadas provienen de bacterias del género *Bacillus*^{22;23;24;25} y en menor proporción de *Pseudomonas*⁴, actinomicetes y hongos filamentosos^{26;27}. En su mayoría son pectato-liasas, aunque también se han encontrado pectin-liasas y endo-poligalacturonasas. No se han descrito pectinasas alcalinas que degradan el *RGI*. Las pectinasas alcalinas han sido empleadas en muchos procesos industriales convencionales, tales como tratamientos de fibras vegetales para la industria textil como ramio (*Boehmeria nivea*), lino (*Linum usitatissimum*), y yute (*Corchorus capsularis*)^{22;23;24; 25} fermentación de té y café; extracción de aceites y tratamiento de efluentes de industrias alimenticias que contengan sustancias pécticas. Del mismo modo, estas enzimas presentan una potencial aplicación en procesos biotecnológicos tales como purificación de virus de plantas y la industria del papel.²⁸. Las

aplicaciones de las pectinasas alcalinas suelen complementarse con otras enzimas alcalinas que degradan pared celular vegetal como celulasas y xilanasas¹.

1.3 Hongos Subdivisión Deuteromycotina

1.3.1 Características Generales

También denominada Fungi Imperfecti (hongos imperfectos), esta subdivisión clasifica a numerosos hongos cuya reproducción sexual no ha sido aún observada. A excepción de las levaduras asporógenas la mayoría de las especies se reproducen por conidios, observándose que los estados conidiales son muy similares a los presentes en algunos Ascomycotinos bien conocidos. Esto permite suponer que los hongos imperfectos representan estados conidiales de Ascomycota (o más raramente Basidiomycota) cuyos estados ascígeros (desarrollo del asco) se forman tan raramente en la naturaleza que no han sido hallados, o bien han desaparecido del ciclo biológico en la evolución de estos organismos.

Con excepción del talo de las levaduras asporógenas, el talo de los Fungi Imperfecti está constituido por un micelio bien desarrollado. Los conidios generalmente son llevados por conidióforos, que pueden producirse en forma laxa e indiscriminada en las hifas somáticas o bien agruparse para constituir varios tipos de cuerpos fructíferos asexuales o conidiomas.

Los caracteres básicos utilizados en la clasificación de estos hongos son la forma de reproducción; ontogenia en la producción de esporos, forma, color y tabicamiento de los conidios.

Los hongos objeto de nuestro estudio son Fungi Imperfecti y se los puede clasificar según la capacidad de crecimiento a distintos valores de pH en alcalino-tolerantes, crecen tanto a pH 9.0-10 como a pH 6.0, y alcalofílicos, crecen solamente a pH 9-10. En la tabla 1.1 se indican algunos de estos hongos, aislados de bosques disturbados y no disturbados, así como su contribución al índice de biodiversidad.

Algunos de ellos como *Penicillium lilacinum* y *Doratomyces stemonitis* se encontraban en gran abundancia en ambos tipos de suelo, mientras que otros como *Verticillium tenerum* aparecían en forma escasa. Algunas especies fueron notablemente afectadas por el impacto de la actividad del hombre sobre el bosque . Tal es el caso de *Gliocladium roseum* que predomina en bosques alterados y *Beauveria bassiana*, cuya presencia en los bosques alterados es prácticamente nula. Otros hongos estudiados que no figuran en la tabla fueron *Volutella ciliata* y *Acremonium terrícola*.

Tabla 1.1 Clasificación de hongos objeto de nuestro estudio

	Contribución al índice de biodiversidad	
	Bosque no disturbado	Bosque disturbado
Hongos alcalino-tolerantes		
<i>Penicillium lilacinum</i>	0.27	0.25
<i>Gliocladium roseum</i>	0.08	0.19
Hongos alcalofílicos		
<i>Doratomyces stemonitis</i>	0.23	0.13
<i>Acremonium sp.</i>	0.12	0.07
<i>Verticillium tenerum</i>	0.02	0.009
<i>Beauveria bassiana</i>	0.009	-

A continuación se describe sucintamente las características de los géneros mencionados anteriormente.

1.3.2 *Gliocladium roseum* Bain

Es un hongo filamentoso ampliamente distribuido en suelos que produce colonias blancas o amarillentas de rápido crecimiento y expansión. Este microorganismo presenta *hifas* tabicadas y transparentes; *conidióforos* erectos y ramificados en sus ápices que dan lugar a la formación de *fiálides*; y *conidios*

unicelulares ovoides o cilíndricos acumulados en esferas terminales simples. Las hifas, conidióforos y fiálides de *Gliocladium* son similares a las de *Penicillium*. Sin embargo, mientras que los conidios de *Penicillium* producen cadenas, los de *Gliocladium* convergen en una gota mucosa para formar una estructura con forma de esfera.

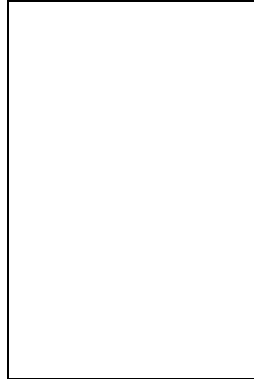


Fig. 1.4 *Gliocladium roseum* Los conidios se acumulan en una gran esfera en extremo de la fiálide. Imagen tomada de <http://www.doctorfungus.org/thefungi.htm> Copyright © 2000 Doctorfungus corporation

1.3.3 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Este hongo filamentoso hialino, usualmente se presenta en el suelo o en restos de vegetales. El crecimiento de *B. bassiana* resulta en colonias blancas, amarillentas o rosadas con aspecto de algodón. Presenta *hifas* transparentes, tabicadas, con contorno regular y algunas ramificaciones. Las *células conidiogénicas* en las hifas tienen forma de botella con filamentos angostos y zigzagueantes en el ápice y suelen formar clusters muy densos. Lateralmente al filamento, los conidios se producen en cada punto de inflexión durante un proceso denominado crecimiento simpodial. Los *conidios* suelen ser ovoides, transparentes y unicelulares.

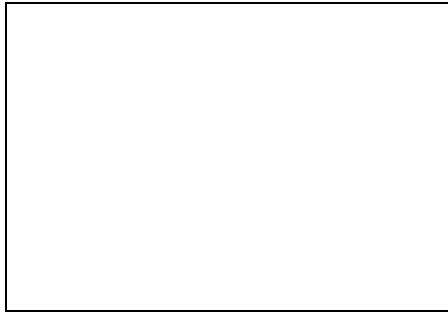


Fig. 1.5: *Beauveria bassiana*, la formación de densos clusters dificulta la visualización de la estructura y disposición de conidios Imagen tomada de McGinnis <http://www.doctorfungus.org/thefungi/beauveria.htm> Copyright © 2000 Doctorfungus corporation.

1.3.4 *Penicillium lilacinum* Thom

Los miembros del género *Penicillium* están ampliamente distribuidos en el suelo, restos de vegetación y el aire. Sus colonias son de rápido crecimiento, muy filamentosas y con textura aterciopelada. Éstas suelen ser blancas al comienzo del cultivo, tornándose verdes, azules, grises, rosadas o amarillas con el paso del tiempo. Este género presenta *hifas* hialinas tabicadas y *conidióforos* simples o ramificados. Dichos conidióforos suelen presentar ramificaciones secundarias que llevan *fiálides* que se organizan formando clusters con forma de cepillo (penicilos). Los *conidios*, son unicelulares, esféricos y usualmente se visualizan como cadenas en los extremos de las fiálides.



Fig. 1.6: *P. lilacinum*. Se observan hifas tabicadas, conidióforos, fiálides conidios y ocasionalmente clamidosporos. Imagen tomada de <http://www.doctorfungus.org/thefungi.htm> Copyright © 2000 Doctorfungus corporation.

1.3.5 *Acremonium sp.*

Son hongos filamentosos cosmopolitas comúnmente aislados de restos vegetales o del suelo. Las colonias de *Acremonium* crecen moderadamente rápido, con textura compacta y aterciopelada. El color de las mismas es blanco o gris pálido con un reverso incoloro; pueden ser planas o plegadas presentando ocasionalmente cierto relieve en el centro. *Acremonium* posee *hifas* tabicadas hialinas, comúnmente muy angostas. Las *fiálides*, que crecen directamente en el extremo de las hifas son solitarias, no ramificadas y erectas. Éstas se separan de las hifas por medio de un tabique y se vuelven cónicas hacia el ápice. En dicho ápice se encuentran los *conidios*, fusiformes, que usualmente aparecen como clústers en esferas unidos a un material gelatinoso. Dichos conidios pueden ser unicelulares o multicelulares, dependiendo de la especie a la que pertenezcan.

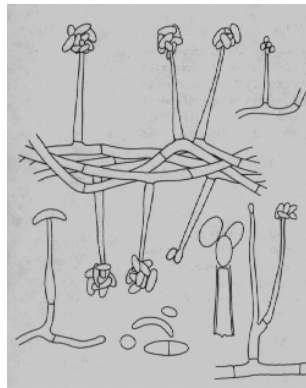


Fig. 1.7: *Acremonium sp.* Los conidios aparecen como clústers en esferas unidos a un material gelatinoso Imagen tomada de Department of Botany University of Toronto David Malloch <http://www.botany.utoronto.ca>

1.3.6 *Doratomyces stemonitis (Pers ex Steud.) Morton & G.S.m*

Doratomyces es un género que suele habitar el suelo y restos vegetales. Se caracteriza por un crecimiento que resulta en colonias negras o castaño oscuras.

Presenta conidióforos castaños oscuros unidos en un fascículo para formar una estructura fructífera compuesta denominada sinema. La parte superior del sinema está cubierta por anélidos con forma de botella de los que surgen las cadenas de conidios grises o castaños.

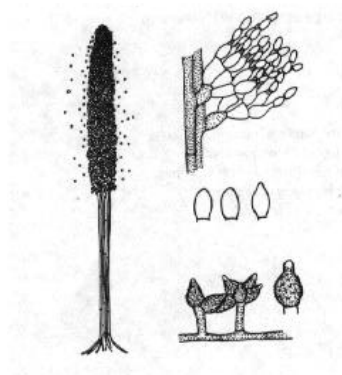


Fig. 1.8: *Doratomyces stemonitis*: Se observan conidios oscuros surgiendo del sinema. Imagen tomada de Department of Botany University of Toronto David Malloch <http://www.botany.utoronto.ca>

1.3.7 *Verticillium tenerum* (Nees ex Pers.) Link

Verticillium es un hongo filamentoso habitante del suelo y restos de plantas cuyas colonias suelen ser blancas al iniciar el crecimiento, pero se convierten en rojas con el paso del tiempo. Algunas especies de *Verticillium* pueden ser patógenas de artrópodos, plantas y otros hongos. Presenta *conidióforos* hialinos, simples o ramificados. La ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo (estructura con forma de rueda con un eje central). De los conidióforos surgen las *fiálides*, que en este caso son muy largas y también están dispuestas en forma de verticilo alrededor del mismo. Los *conidios* son unicelulares, ovalados o piriformes. Pueden ser solitarios o formar clusters en las puntas de los ápices.

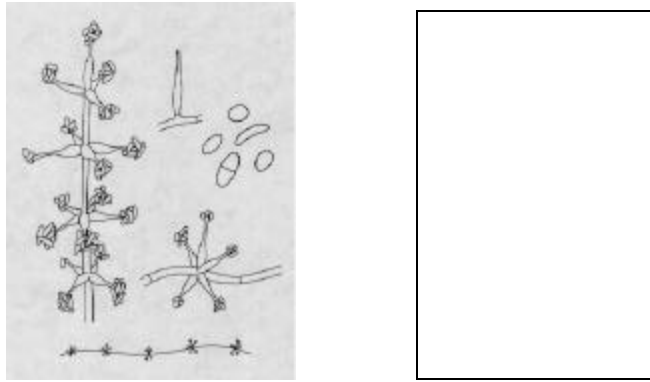


Fig. 1.9: *Verticillium Tenerum*: la ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo. Imagen tomada de Department of Botany University of Toronto David Malloch <http://www.botany.utoronto.ca>

1.3.8 *Volutella ciliata* Alb. & Schw. ex Fr.

Este género de hongos habita el suelo y restos de vegetales. Presenta ramificaciones alrededor del esporodio (cuerpo fructífero asexual pequeño compuesto por un estroma que carga una capa compacta de conióforos en su superficie). Dichas ramificaciones actúan como un escudo contra depredadores. Los conidios suelen estar envueltos en una sustancia muy viscosa.



Fig. 1.10 *Volutella ciliata* surgiendo de restos de una hoja. Imagen tomada de <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCE2002/volutell.htm>

1.4 Cultivos de hongos

In vitro, los hongos pueden cultivarse en superficie sobre medios agarizados, o bien sobre medios particulados sin agua libre, proceso que se denomina fermentación en sustrato sólido (FSS). Alternativamente se los puede cultivar en medios líquidos (cultivos sumergidos) donde el micelio se encuentra completamente disperso en el medio acuoso. Desde el punto de vista fisiológico, la FSS es el cultivo que probablemente mejor refleje las condiciones ambientales que estos hongos encuentran en el suelo. Los hongos filamentosos son los microorganismos mejor adaptados a este tipo de sistema, ya que el crecimiento en forma de hifas los favorece desde el punto de vista de la colonización y el aprovechamiento de nutrientes disponibles. La FSS se puede realizar empleando sustratos naturales con alta capacidad de adsorber agua, como granos (arroz, cebada), residuos agroindustriales (afrecho, pomazas de frutas) o bien utilizando un soporte poroso inerte impregnado con medio nutritivo. Algunos soportes empleados a tal fin son la perlita, cáñamo, paja de trigo y/o arroz. La elección del soporte depende de su capacidad de absorción de agua, porosidad y tamaño de partícula, factores que cumplen un rol fundamental en el control de humedad y temperatura y aireación del sustrato. En el presente trabajo se adoptó como sistema de cultivo la FSS empleando un sustrato inerte poroso como la perlita impregnado con un medio nutritivo alcalino, De este modo se trata de simular el ambiente calcáreo de los suelos que habitan los microorganismos en estudio.

1.5 Objetivo y plan de trabajo

El objetivo del presente trabajo fue el screening de actividades enzimáticas de ocho cepas de hongos alcalino-tolerantes o alcalofílicos, focalizando el mismo en las enzimas que degradan pared celular vegetal. Para alcanzar el objetivo propuesto se desarrolló el siguiente plan de trabajo:

- ❖ Conservación de las cepas mediante liofilización.
- ❖ Estudio preliminar de los requerimientos nutricionales de los hongos para seleccionar un medio base de cultivo.
- ❖ Elección del sistema de cultivo para inducir las enzimas (FSS).
- ❖ Cultivo de los hongos en un medio de referencia con una fuente simple de carbono (como glucosa) y en medios con pectina y extractos vegetales como potenciales inductores de la actividad enzimática.
- ❖ Realizar el screening de las actividades enzimáticas empleando sustratos y condiciones de reacción específicos a pH 9.5.
- ❖ Purificar alguna enzima de interés y determinar sus propiedades mas relevantes.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Pectina cítrica (85 % de AGA anhidro, grado de metoxilación GM, 53 % y 93%), ácido poligalacturónico (APG; sal sódica, 90 % de AGA anhidro), xilano de madera de haya, AG de madera de alerce, *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pnp-Glu), *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pnp-Ram) 3-fenil-fenol (*m*-hidroxidifenilo); carboximetilcelulosa (CMC) y AGA monohidrato fueron obtenidos de Sigma. Agar papa-dextrosa (APD) fue de Merck y la triptona de Difco.

El RG de soja fue obtenido de Megazyme (Irlanda). Este sustrato es preparado a partir de fibras de soja mediante la hidrólisis exhaustiva con enzimas pécticas, celulasas y proteasas. La estructura resultante es resistente a la degradación por endo-xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas. El producto comercial tiene bajo contenido de Ara y Gal debido al tratamiento enzimático efectuado con β -galactosidasa y α -L-arabinofuranosidasas que remueve las cadenas laterales. Esto aumenta el contenido relativo de residuos Xil que se encontrarían unidos al AGA en el xilogalacturonano o a Ram en el RG. En la *Tabla 21* se presenta la composición del RG comercial

Tabla 2.1. Composición de RG de soja (moles %)

Azúcar	moles %
Acido galacturónico	48
Ramnosa	18.5
Arabinosa	6.5
Galactosa	1.1
Xilosa	25.2

El jugo V8®, cuyo contenido de carbohidratos totales fue de 30 g/l, es producido y distribuido por Campbell Soup Company. El mismo se clarificó por adición de CaCO_3 (12.5g/l) y centrifugación ²⁹.

La naringina, (85 % de pureza) fue provista gentilmente por el Dr Guillermo Ellenriedel de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Salta. La naringina técnica debió ser purificada antes de emplearla como sustrato en la reacción con α -ramnosidasa. Para tal fin, se efectuó una recrystalización disolviendo 470 mg de naringina técnica en 5 ml de etanol a 75° C. Dicha mezcla se centrifugó para remover la fracción insoluble y se cristalizó. Luego del secado se obtuvo un sólido cristalino blanco con un punto de fusion de 170°C, coincidente con el valor de bibliografía. El proceso de purificación del sustrato se verificó por medio de TLC, empleando metanol como sistema de corrida.

Una vez obtenida la naringina con una pureza mínima del 95%, se la disolvió en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 9.5 a una concentración de 1 mg/ml para ser usada como sustrato de la ramnosidasa.

Para la FSS se empleó perlita expandida (PERLOME) como material inerte. Perlita es un nombre genérico que designa un cierto tipo de roca o vidrio natural. Su principal característica es que al ser calentada a temperaturas superiores a 800 °C sufre un proceso de expansión (por evaporación del agua ligada) que incrementa su volumen entre 4 y 20 veces respecto al original (perlita expandida). El material resultante es de color blanco, posee alta porosidad, pH neutro y puede absorber varias veces su peso en agua. El producto comercial se tamizó, utilizándose la fracción que pasa malla de 2 mm (+16) y se retiene en malla de 1.18 mm (-10).

La cromatografía en columna se efectuó con un equipo FPLC (AKTA Amersham, Biochem). La cromatografía en capa fina se realizó con cromatofolios de aluminio o cromatoplasas de HPTLC (silica gel 60 F254, Merck) Los análisis mediante SDS-PAGE fueron llevados a cabo en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefer SE 260). Las columnas PD-10 y patrones de proteína de bajo peso

molecular (14.4 a 94 kDa) para electroforesis fueron obtenidos de Amersham Biotech

2.2 Conservación de las cepas

Todas las cepas empleadas fueron proporcionadas por la Doctora Marta Cabello del Instituto Spegazzini, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Las mismas se recibieron como cultivos en tubos con medio agarizado. Del cultivo original, se sembraron placas con medio APG o AM (según la cepa) para producir conidios, los cuales se resuspendieron en una solución crioprotectora de leche descremada (10% P/V) e inositol trifosfato (5% P/V) y se liofilizaron. Al final del proceso, las ampollas con el liofilizado fueron saturadas con N₂ a los efectos de excluir la posible presencia de O₂ y vapor de agua, se sellaron y se conservaron a 5°C. Para el desarrollo de los cultivos, las cepas liofilizadas se recuperaron por medio de rehidratación lenta con agua estéril seguida por plaqueo en medio de mantenimiento AM. Este cultivo, denominado cultivo stock (CS), se conservó refrigerado por un período no mayor de 2 meses; transcurrido este tiempo se desechó y se preparó uno nuevo. Todos los cultivos se iniciaron a partir del CS.

2.3 Medios y condiciones de cultivo

2.3.1 Medios de mantenimiento y esporulación

Agar Malta (AM): 2 % de extracto de malta, 1.5 % de agar; pH: 7.5.

Agar papa glucosa (APG): según especificaciones del producto, pH 7.5

2.3.2 Cultivos en medios agarizados para el estudio preliminar de crecimiento en superficie

Con el propósito de establecer un medio de cultivo apropiado para el cultivo de los hongos en estudio se evaluó el crecimiento de las cepas en cuatro medios en los que se variaba alternativamente la fuente de carbono y energía y/o la fuente de nitrógeno y cuya composición se tomó del trabajo de Contreras y col.³⁰. Para inhibir la contaminación bacteriana se incorporó a los mismos estreptomicina (100 ppm) y cloranfenicol (40 ppm). El ajuste del pH se realizó agregando una mezcla de fosfato y carbonato de sodio tal como lo describió Cabello y col.³. La composición del medio base fue la que se describe a continuación:

Medio base (g/l) : Fuente de carbono 5.0, fuente de N 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, ácido cítrico 0.01, Agar 14; Solución buffer 100 ml; solución de antibióticos 4 ml. El pH final del medio fue 9.0.

La solución buffer estaba compuesta (g/l): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9; Na_2CO_3 1.0 y la solución de antibióticos (g/l): estreptomicina 25.0, cloranfenicol 10.0

Como fuentes de carbono y nitrógeno se emplearon las siguientes combinaciones: glucosa/triptona, glucosa/peptona de soja, sacarosa/triptona y sacarosa/peptona de soja respectivamente.

Para el desarrollo de los cultivos, se inocularon cajas de Petri conteniendo medio AM o APG con CS de cada una de las cepas. Luego de diez días de crecimiento, se tomaron porciones de 5 mm de lado de la parte periférica de la colonia y se transfirieron al centro de nuevas cajas de petri conteniendo 20 ml del medio en estudio. El desarrollo de la colonia se evaluó midiendo el crecimiento radial en mm a las 120, 168, 240 y 269 horas, bajo condiciones controladas de temperatura (30 °C) y en oscuridad. El ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los medios.

2.3.3 Fermentación en sustrato sólido (FSS)

2.3.3.1 Producción del inóculo de conidios

Para la obtención de conidios, se inocularon con CS de cada cepa, cajas de Petri con 20 ml de medio AM o APG. Luego de incubar 10 días a 30 °C en oscuridad, los conidios se resuspendieron con 10 ml de solución estéril de Tween 80 al 0.05% p/v, y se efectuó su recuento en cámara de Neubauer.

2.3.3.2 Cultivo con Perlita

Para la FSS se colocaron 2.5 g de perlita en una caja de Petri y se esterilizó autoclavando 30 min a 121 °C. Una vez seca, la perlita se impregnó con 15 ml de medio nutritivo estéril previamente inoculado con conidios en concentración de 10^6 conidios/ml. Las cajas se incubaron a 30° C en atmósfera saturada de humedad durante 72 hs. Transcurrido dicho período, se realizó el procesamiento de cada cultivo. La composición de los medios empleados es la que se detalla a continuación:

Medio Glucosa, MG (g/l) : Glucosa 5.0, triptona 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, ácido cítrico 0.01. Solución buffer 100 ml; solución de antibióticos 4 ml. El pH final del medio fue 9.0-9.5 antes de autoclavar.

Medio Pectina, MP: idem MG reemplazando la glucosa por pectina cítrica (53 % grado de metoxilación)

Medio con V-8, MV8: idem MG pero reemplazando la glucosa por jugo V-8 clarificado en concentración equivalente a 3.0 g/l de azúcares totales

En todos los casos, la glucosa, pectina, jugo V8 clarificado, la fuente de N junto con las sales y la solución buffer se esterilizaron por separado en autoclave por 30 min a 121° C. Por otro lado, los antibióticos se esterilizaron por filtración. Luego de la esterilización, y una vez reconstituídos los medios, el pH de los mismos osciló entre 8.9 y 9.1.

2.3.3.3 Procesamiento de los cultivos

Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo la cosecha de cada cultivo. Para la obtención del extracto, se resuspendieron 5 g de cultivo en 10 ml de agua. La suspensión se agitó con un agitador magnético durante 30 minutos, se determinó su pH y se filtró a través de papel de celulosa (Whatman 40). Del filtrado (extractivo) se tomaron 7 ml para liofilizar con el objetivo de concentrar el extracto y el resto se congeló para su posterior análisis. Los liofilizados se conservaron refrigerados. El resto de medio sólido se empleó para determinaciones de humedad. Las muestras se tomaron al inicio y al final del cultivo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.3.4 Caracterización de la perlita

La máxima capacidad de absorción de agua de la perlita se determinó por gravimetría empleándose una técnica análoga a la que se usa para determinar la capacidad de campo de un suelo. Para determinar las isothermas de adsorción/desorción de agua, la perlita seca se autoclavó 20 min a 121 °C (condiciones empleadas para la esterilización del medio). Para el ensayo de desorción, la perlita se impregnó con agua destilada (7ml de agua/g de material autoclavado) y se incubó a 25 °C en recipientes herméticos bajo distintas condiciones de humedad relativa del aire hasta lograr el equilibrio (15 días). Para la isoterma de adsorción el material seco se incubó en las mismas condiciones que en la isoterma de desorción. Las distintas condiciones de humedad relativa se obtuvieron empleando soluciones de glicerol, para lo cual la fracción molar de agua (humedad relativa) se calculó empleando la ley de Raoult:

$$a_w = n_1 / (n_1 + n_2)$$

donde n_1 : moles de agua

n_2 : moles de glicerol

El contenido de agua del material una vez establecido el equilibrio se determinó por gravimetría a 80 °C y se expresó como g agua /g de material seco. Los ensayos se realizaron por duplicado. Todos los resultados son representativos de al menos dos experimentos similares.

2.4 Metodología Analítica

2.4.1 Determinación de carbohidratos

La glucosa se determinó con el kit enzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa (Wiener, Argentina); la pectina por el método del m-hidroxidifenilo empleando ácido galacturónico como patrón ³¹ y los azúcares totales por la técnica del Fenol/H₂SO₄ empleando glucosa como patrón ³²

2.4.2 Determinación de humedad

El contenido de agua de la perlita o los cultivos se efectuó por gravimetría a 80°C.

2.4.3 Determinación de proteína

La proteína soluble se determinó por la técnica de Lowry.³³

2.5 Determinación de actividades enzimáticas

2.5.1 Preparación de las muestras de enzima

Cada muestra liofilizada se resuspendió en 350 µl de agua bidestilada (concentración 10 x respecto del extracto) y se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar cualquier resto de material insoluble. El sobrenadante

o muestra de enzima (ME) se conservó en baño de hielo hasta el momento de su utilización.

2.5.2 Actividad glicosidasa.

Las actividades β -glucosidasa, α -L-ramnosidasa y β -galactosidasa se determinaron con pnp-Glu, pnp-Ram y ONPG. Estos compuestos al ser hidrolizados desarrollan en medio alcalino un color amarillo por la aparición del anión p-nitrofenolato u o-nitrofenolato. La adsorción alcanza su máximo valor a pH 10. Para la determinación cualitativa de la actividad glicosidasa se empleó el test de placa con agarosa. Para ello se utilizaron placas de petri con 9 ml de gel de agarosa al 2.4% en buffer Tris-HCl 150 mM, pH 9.0, 0.2 % de sustrato y 0.03 % de azida de sodio como conservante. Una vez formado el gel, se realizaron 7 perforaciones de 1 mm de diámetro en cada una de las placas con el fin de sembrar las ME. La reacción se desarrolló a 37°C durante 3 hs. La presencia de halos amarillos alrededor de cada celda se empleó como indicativo de la hidrólisis del sustrato cromogénico.

Estos ensayos también se efectuaron en solución, deteniendo la reacción con 400 μ l de Na_2CO_3 0.5M transcurrido un tiempo fijo o siguiendo una cinética midiendo en espectrofotómetro a 420 nm. La mezcla de reacción contuvo 30 μ l de la solución de sustrato (5 mM en buffer), 260 μ l de buffer Tris-HCl 150 mM pH 9.5 y 10 μ l de ME. En el caso de la cinética, la aparición de color se siguió durante 60 min a 405 nm en un equipo Beckman DU 640. El o-nitrofenolato o p-nitrofenolato liberados se evaluaron a 420 nm ($\epsilon = 4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y a 405 nm ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente.

2.5.3 Actividad liasa

Las actividades de pectin-liasa y pectato-liasa se determinaron espectrofotométricamente a 235 nm.³⁴ Como sustratos se emplearon pectina (GE 93 %) al 2 % en buffer Tris-HCl 100 mM pH 9.0 (pectin-liasa) o APG al 2 % en buffer

Tris-HCl 100 mM pH 9.0 conteniendo 2 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pectato-liasa). Para efectuar la reacción se mezclaron 280 μl de sustrato y 20 μl de ME. La concentración de productos insaturados se estimó a partir de la absorptividad a 235 nm ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2.5.4 Medidas de actividad enzimática por incremento de poder reductor

La actividad enzimática sobre sustratos poliméricos fue calculada a partir del incremento de extremos reductores medido por la técnica de Somogyi-Nelson^{35 36} empleando azúcares apropiados como patrones para las curvas de calibración. Se prepararon soluciones al 0.4 % en agua deionizada de cada uno de los siguientes sustratos: CMC; Xil; AGA, Pectina (GE 93 %); APG y RG Para efectuar la reacción enzimática se mezclaron 95 μl de solución de sustrato, 95 μl de buffer Tris-HCl 100 mM pH 9 y 10 μl de ME. La reacción se desarrolló durante 3 horas, transcurrido dicho periodo, se determinó la concentración de reductores. Se hicieron blancos de muestra y de sustrato correspondientes en todos los casos.

2.5.5 Definición de actividad enzimática:

Las unidades de actividad enzimática se refieren a medidas de velocidad inicial. La unidad corresponde a la cantidad de enzima que genera un μmol de producto por minuto en las condiciones de reacción establecidas. Todas las actividades se midieron a 37°C

2.6 Purificación de ramnosidasa alcalina

Para la purificación de la actividad ramnosidasa se procedió de la siguiente manera: el liofilizado de un cultivo con inductor se redisolvió en buffer Tris-HCl, 20 mM, pH 8.0 a una concentración 10 x (extracto concentrado) y se clarificó por

filtración empleando filtros de fibra de vidrio (OSMONICS). La solución clarificada se pasó por una columna PD-10 equilibrada con el mismo buffer a los efectos de desalinizar y equilibrar la muestra para la subsiguiente etapa cromatográfica (muestra PD-10). La solución resultante se aplicó a una columna de intercambio aniónico (Sephacrose Q Fast Flow, 1 ml), equilibrada con buffer Tris-HCl, 20 mM, pH 8.0. La actividad ramnosidasa se adsorbió a la matriz bajo estas condiciones, lo que sugiere un pI de la(s) proteína(s) < 8.0. La elución se efectuó mediante un gradiente de NaCl (0-0.5 M) en el mismo buffer. Las fracciones activas se juntaron (muestra Sepharose Q), y luego de desalinizarlas en una columna PD-10 equilibrada con buffer se liofilizaron. Cuando se requirió, el preparado enzimático se resuspendió con agua deionizada a una concentración 10 x (liofilizado final).

2.7 Técnicas Bioquímicas

La electroforesis desnaturante se realizó con geles de poliacrilamida al 10 % en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefer SE 260) ³⁷ a 100 V por 120 min. Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con plata ³⁸. La cromatografía en columna se realizó a temperatura ambiente empleando un sistema FPLC (Amersham, Biochem). La cromatografía en capa fina se efectuó por el empleo de la técnica ascendente utilizando como sistema de corrida acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (10:1.1:1.1:2.7 v/v/v/v). Para la corrida, se sembraron 10 µl de muestra inactivada por calor. Luego de eliminar los solventes, la detección de los productos de reacción se realizó pulverizando sobre la placa una solución al 3 % de ácido fosfomolibdico y 10 % de ácido sulfúrico en alcohol etílico. Para desarrollar color las placas fueron calentadas por 5 minutos a 105° ³⁹

3 Resultados

3.1 Estudio preliminar de crecimiento en medios agarizados

A los efectos de establecer la composición más adecuada del medio de cultivo a emplear en la FSS, se realizó un estudio preliminar de crecimiento de cada una de las cepas en distintos medios agarizados. El crecimiento en cada caso se estimó midiendo el aumento del diámetro de colonia en función del tiempo. A partir del crecimiento radial de la colonia, se comprobó que todas las cepas crecieron en los medios ensayados. En general, la mayor velocidad de crecimiento se observó en el medio glucosa/triptona, por lo cual se seleccionó este medio para la FSS.

Resultó interesante estimar el crecimiento radial en forma cuantitativa. Para tal fin se empleó el modelo Pirt⁵ quién desarrolló un modelo general de crecimiento de colonias bacterianas, usando un razonamiento similar a aquel aplicado al crecimiento en pellets en cultivos sumergidos. El mismo fue redefinido por Trinci⁴⁰ para el crecimiento de hongos filamentosos.

En dicho modelo, se asume que inicialmente el crecimiento de la masa de una colonia es exponencial, es decir:

$$x_t = x_0 e^{\mu t} = (\pi H d r_0^2) e^{\mu t}$$

donde: r_0 es el radio de colonia a $t = t_0$,

H es el alto de colonia

d la densidad. de colonia

Aplicando logaritmos, esta ecuación resulta en:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t = \ln r_0^2 \pi H d + \mu t$$

entonces

$$\ln r_t = \ln r_0 + \frac{1}{2} \mu t$$

Una vez que la colonia alcanza un tamaño tal que la difusión de los nutrientes hacia el centro disminuye hasta ser menor que la demanda, el crecimiento exponencial cesará en el centro. Es decir, si bien la parte periférica de la colonia seguirá creciendo a máxima velocidad, el centro de la misma habrá dejado de crecer. En este caso la ecuación anterior no es aplicable. Sin embargo, debido a que en este caso solo se realizó un análisis comparativo, se tomaron en cuenta únicamente los valores iniciales del diámetro de colonia para estimar el μ , es decir la fase logarítmica de crecimiento. A partir de dichas correlaciones, se obtuvieron valores de μ entre 0.0110 y 0.0170 h^{-1} para las cepas en estudio. En la figura 3.1 se muestra una curva típica de crecimiento de *Verticillium tenerum* en el medio glucosa/triptona.

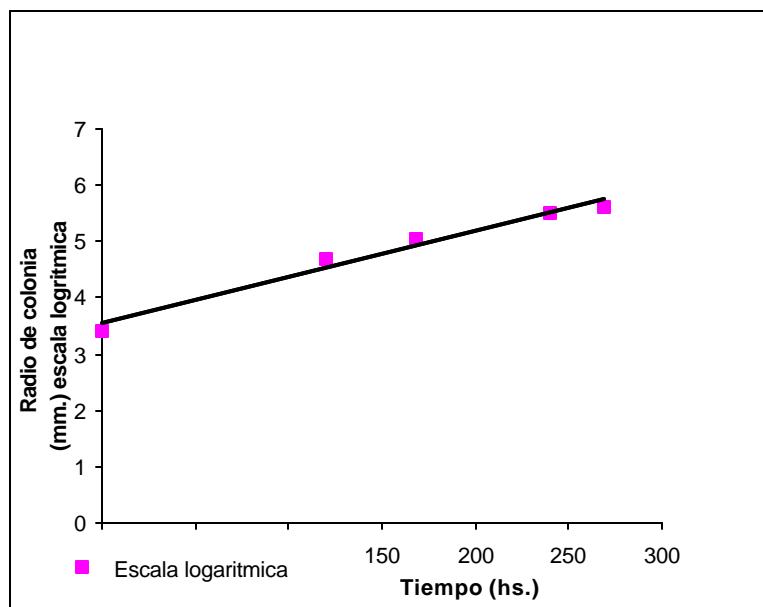


Fig. 3.1 Curva de crecimiento de *Verticillium tenerum* en medio con glucosa y triptona

Si bien los valores de μ son algo inferiores a los reportados para otros hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*, se encuentran dentro del rango característico

reportados para hongos en general ⁴⁰. Esto demuestra la adaptación de estos hongos a crecer en medio alcalino.

3.2 Crecimiento en FSS

3.2.1 Propiedades de hidratación de la perlita

Un aspecto crítico de la FSS es el control de la actividad acuosa (a_w) del medio, ya que en este tipo de cultivos la mayor parte del agua se encuentra adsorbida en el material poroso. La disminución de a_w a valores debajo del óptimo afecta marcadamente el crecimiento de los hongos (y microorganismos en general) lo que se manifiesta en una extensión de la fase de latencia, disminución la velocidad específica de crecimiento y reducción de la producción de biomasa. Si bien los hongos pueden tolerar valores de a_w del orden de 0.95, en este trabajo se asumió como valor mínimo aceptable para el crecimiento, un valor de a_w de 0.98.

Como es sabido, todo cuerpo poroso en contacto con un ambiente adsorbe o pierde humedad si no hay una igualdad entre las presiones parciales de vapor del aire circundante y del cuerpo húmedo. Mientras que los valores de la presión de vapor sean diferentes, habrá una transferencia de humedad del cuerpo al medio circundante o viceversa. La importancia o magnitud de esta diferencia depende esencialmente de la humedad relativa (HR) del aire.⁴¹ Cabe destacar que durante este proceso la temperatura del cuerpo poroso tiende a alcanzar la temperatura seca del ambiente. Se concluye de lo anterior que existe una relación directa entre la temperatura, la humedad de un ambiente dado y la humedad de equilibrio del material. Se llega de esta forma a la noción de equilibrio higroscópico que en realidad corresponde al equilibrio entre las presiones parciales de vapor del aire del ambiente y del producto húmedo. Por definición, la a_w del sólido es el valor de la HR con la cual está en equilibrio y corresponde a la disponibilidad del agua para intervenir en reacciones de cualquier tipo. En general el contenido de agua en equilibrio varía según provenga de un proceso de desorción o adsorción, fenómeno conocido como histéresis ⁴² y depende a su vez de la micro y macroporosidad del

sólido. Para caracterizar la perlita en relación a sus propiedades de hidratación (relación entre contenido de agua y a_w), se determinaron la máxima capacidad de adsorción de agua y las isothermas de adsorción y desorción en el rango de a_w 1.0 a 0.9.

La máxima capacidad de adsorción de agua empleando la técnica por gravedad resultó ser de 7.5 ml/g de perlita. En la Tabla 3.1 se muestran los valores de humedad en equilibrio para los procesos de adsorción y desorción de agua.

Actividad acuosa	Humedad de la perlita g H ₂ O / g seco	
	adsorción	desorción
1	0.258	6.74
0.98	0.078	6.29
0.96	0.038	5.46
0.94	0.036	4.19
0.90	-	1.58

Tabla 3.1: Valores de humedad en equilibrio de Perlita a 25 °C. Perlita comercial tamizada (+10;-16) y autoclavada seca (30 min a 121 °C). Para la isoterma de desorción, 1g de perlita se impregnó con 7 ml de agua.

En la figura 3.2 se observan los perfiles de adsorción y desorción de agua correspondientes a dicho material.

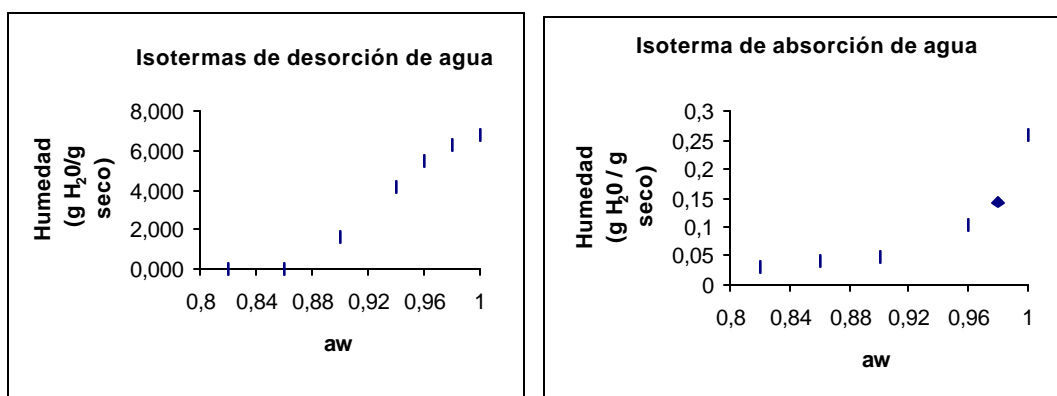


Fig. 3.2 Isothermas de desorción y adsorción de agua de Perlita. Las características del material son las decriptas en la tabla.

Tal como era de esperarse, la humedad del sólido en equilibrio es menor durante la adsorción que en la desorción. Los procesos son opuestos, pero no reversibles por un camino común, verificándose de este modo el fenómeno de histéresis. A partir de estos resultados debe tenerse en cuenta que para lograr un valor de a_w de 0.98 como mínimo aceptable para los cultivos, la humedad del soporte no debe ser inferior a 6 g de H_2O / g de sólido seco.

3.2.2 Crecimiento fúngico en medio con perlita

En las tablas siguientes se muestran datos de las FSS empleando perlita impregnada con cada uno de los medios descriptos anteriormente.

Tabla 3.2 Datos de los cultivos de hongos en perlita. La concentración de fuente de carbono inicial fue la siguiente: Glucosa 5 g/l; Pectina (Expresada como ácido Galacturónico) y carbohidratos totales (medio V8) ~ 3.0 g/L. La humedad inicial fue del orden 6.3 g de agua por gramo seco

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Gliocladium roseum</i>	Glucosa	9.31	8.94	6.058	0.0
	Pectina	9.52	8.96	6.055	151.0
	V-8	9.3	9.09	6.054	328.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Beauveria bassiana</i>	Glucosa	9.31	8.93	5.986	0.0
	Pectina	9.52	9.12	6.044	2767.0
	V-8	9.3	9.03	6.048	410.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Penicillium lilacinum</i>	Glucosa	9.23	9.19	6.019	0.0
	Pectina	9.44	9.3	6.074	1915.0
	V-8	9.26	9.27	6.018	268.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Acremonium sp</i>	Glucosa	9.23	8.85	5.980	0.0
	Pectina	9.44	8.74	6.011	3054.0
	V-8	9.26	8.9	6.023	207.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Doratomyces stemonitis</i>	Glucosa	9.14	8.83	5.992	0.0
	Pectina	9.11	8.73	5.975	2155.0
	V-8	9.17	8.95	6.034	284.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Acremonium terricola</i>	Glucosa	9.14	8.97	6.088	0.0
	Pectina	9.11	8.91	6.043	2397.0
	V-8	9.17	9.01	6.056	271.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Verticillium tenerum</i>	Glucosa	9.19	9.04	5.990	0.0
	Pectina	9.28	8.99	6.074	226.0
	V-8	9.35	9.08	5.989	197.0

Cepa	Fuente de Carbono	pH inicial	pH final	Humedad final g/g	FC final (ppm)
<i>Volutella ciliata</i>	Glucosa	9.19	8.84	6.041	0.0
	Pectina	9.28	9.03	6.050	2229.0
	V-8	9.35	8.98	5.965	1069.0

Todos los cultivos se iniciaron con aproximadamente 6.3 g agua/g seco y con un pH de alrededor de 9.0. Los datos de la tabla muestran claramente la efectividad del sistema empleado en cuanto al control de parámetros, ya que los valores de pH se mantuvieron en el rango alcalino y los valores finales de humedad fueron del orden de 6 g de agua/ g seco (valor mínimo aceptable preestablecido). Bajo estas condiciones, todos los hongos crecieron eficientemente en el medio con glucosa,

como lo demuestra el consumo de dicha fuente de carbono (superior al 95% en todos los casos).

La capacidad de crecer en pectina se observó solo en dos hongos, *V. tenerum* y *G. roseum* (consumo 90-95 %) mientras que el consumo fue parcial en los cultivos de *P. lilacinum*, *D. stemonitis*, *A. terrícola* y *V. ciliata*, y casi nulo en *Acremonium sp* y *B. bassiana*.

En los medios con jugo V8 el consumo de azúcares totales fue elevado (> 90 %) excepto en el cultivo de *Volutella*, lo cual indica que los hongos metabolizan fácilmente los azúcares simples presentes en este jugo, en consistencia con el crecimiento de los hongos en el medio con glucosa.

Importante es destacar la versatilidad metabólica de *V. tenerum* considerando que es uno de los hongos con menor contribución al índice de biodiversidad en su ambiente natural. No obstante esta característica es común en otras especies de *Verticillium*, en particular las fitopatógenas.

3.3 Screening de actividades enzimáticas

3.3.1 Actividad pectolítica :

En la tabla 3.3 se muestran los valores de actividad enzimática sobre pectina altamente esterificada y APG, determinados por incremento de absorbancia a 235 nm. (actividad liasa) y sobre estos sustratos y RG, por aumento de poder reductor (actividad pectinasa, poligalacturonasa y RGasa respectivamente).

La presencia de enzimas capaces de degradar pectina altamente esterificada fue observada principalmente en los cultivos con *V. tenerum* y *G. roseum* y en casos aislados en los cultivos de *P. lilacinum* (medio pectina) y *D. stemonitis* (medio V8)

Los valores de actividad liasa comparada con los de pectinasa, indican a la pectin-liasa como la enzima responsable de la degradación de dicho sustrato

Tabla 3.3: Actividades enzimáticas producidas por las cepas en estudio en distintos medios de cultivo (mU/ml).

		Sustrato Pectina (93 % GE)		Sustrato APG		RG
Cepa	Medio de cultivo	Pectin-liasa**	Pectinasa*	Pectato-liasa**	PGasa*	RGasa*
<i>G. roseum</i>	Glucosa	1.31	2.0	<1.	1.6	<1.0
	Pectina	4.83	<1.0	1.31	<1.0	<1.0
	V-8	18.25	<1.0	1.55	<1.0	12.3
<i>B. bassiana</i>	Glucosa	0.74	1.2	1.80	<1.0	<1.0
	Pectina	1.88	1.7	6.87	<1.0	4.0
	V-8	1.96	<1.0	7.69	1.4	1.5
<i>P. lilacinum</i>	Glucosa	ND	3.4	ND	<1.0	1.5
	Pectina	16.69	1.4	2.78	<1.0	<1.0
	V-8	0.82	2.9	1.88	<1.0	<1.0
<i>Acremonium sp.</i>	Glucosa	0.98	1.1	0.41	<1.0	<1.0
	Pectina	ND	1.7	7.28	<1.0	2.3
	V-8	7.94	4.5	0.82	<1.0	<1.0
<i>D. stemonitis</i>	Glucosa	ND	<1.0	1.23	<1.0	<1.0
	Pectina	ND	<1.0	9.82	<1.0	<1.0
	V-8	12.93	1.6	5.15	<1.0	<1.0
<i>A. terricola</i>	Glucosa	0.74	5.6	0.49	1.5	8.4
	Pectina	3.76	<1.0	3.19	<1.0	<1.0
	V-8	5.48	<1.0	10.55	<1.0	<1.0
<i>V. tenerum</i>	Glucosa	22.9	11.0	1.23	8.2	6.0
	Pectina	38.45	12.5	16.5	10.3	10.0
	V-8	49.1	10.1	5.65	8.7	7.3
<i>V. ciliata</i>	Glucosa	0.90	2.4	1.15	1.2	<1.0
	Pectina	2.70	1.4	3.52	7.0	<1.0
	V-8	4.91	1.6	2.70	<1.0	<1.0

*Actividades medidas por incremento de absorbancia a 235 nm,

** Actividades medidas por incremento del poder reductor empleando el método de Somogyi-Nelson.

Nota: Debido a la sensibilidad del método de medida, para el caso de pectinasas, poligalacturonasas y RGasas no se detallan las unidades de actividad cuando esta es inferior a 1mU. Del mismo modo, para las actividades pectin liasa y pectato liasa, los valores de mU menores que 10 están muy cercanos al error experimental y son medidas que deben ser confirmadas.

Con respecto a la degradación del sustrato APG, los datos sugieren cierta expresión de pectato-liasa en algunos de estos hongos y en forma muy significativa en *V. tenerum* en el medio con pectina. Es interesante destacar este resultado ya que

los hongos saprótrofos en general no se caracterizan por producir este tipo de enzimas. Por tal motivo estos datos deben ser confirmados en estudios posteriores.

Por su parte, la alta actividad PGasa en los cultivos de *V. tenerum*, sugieren la presencia de poligalacturonasas en el pool pectolítico de este hongo. A los efectos de determinar si el mecanismo de acción de las poligalacturonasas es endo o exo, debería efectuarse una comparación del incremento de poder reductor con la caída de viscosidad del sustrato.

Con respecto a la posible presencia de enzimas alcalinas que degradan RG, son llamativos los datos de actividad RGasa en los cultivos de *V. tenerum* y *G. roseum* (medio V8). Este sería el primer reporte de enzimas fúngicas alcalinas que degradan RG.

En la tabla 3.4 se detallan los valores de actividad enzimática sobre sustratos poliméricos no pécticos, como CMC y xilano, que representan el resto de los componentes de la pared celular vegetal.

A diferencia de lo que ocurre con la pectina, estos hongos presentan una mayor capacidad de degradar celulosa y xilosa. En este sentido es interesante destacar la actividad xilanolítica producida por los hongos del género *Acremonium* y *D. stemonitis*, y celulolítica de *B. bassiana*, cuya actividad pectolítica fue poco significativa.

Los resultados muestran también que *V. tenerum* se destaca por su actividad degradadora de celulosa y xilano. Todos los cultivos de este hongo mostraron actividad frente a arabinogalactano, lo cual sugiere la presencia de enzimas que degradan las ramificaciones laterales de la pectina. A partir de estos resultados podemos concluir que este hongo está altamente adaptado para degradar la pared celular vegetal.

Tabla 3.4: Resultados de actividad enzimática (mU/ml) en ensayo sobre sustratos poliméricos no péclicos.

Extracto		SUSTRATOS	
Cepa	Medio de cultivo	CMC*	XIL*
<i>G. roseum</i>	Glucosa	8.05	8.69
	Pectina	1.80	9.43
	V-8	3.08	0.06
<i>B. bassiana</i>	Glucosa	3.34	0.80
	Pectina	0.04	2.86
	V-8	12.27	3.39
<i>P. lilacinum</i>	Glucosa	4.34	8.91
	Pectina	0.05	0.32
	V-8	3.71	6.84
<i>Acremonium. sp</i>	Glucosa	0.16	0.96
	Pectina	8.76	15.66
	V-8	3.46	14.70
<i>D. stemonitis</i>	Glucosa	0.52	1.92
	Pectina	0.16	10.00
	V-8	2.66	11.37
<i>A. terricola</i>	Glucosa	5.36	18.90
	Pectina	1.31	26.13
	V-8	0.30	29.20
<i>V. tenerum</i>	Glucosa	31.67	12.55
	Pectina	41.98	10.38
	V-8	35.44	2.64
<i>V. ciliata</i>	Glucosa	0	0
	Pectina	2.9	1.90
	V-8	3.8	1.99

* Actividades medidas por incremento del poder reductor empleando el método de Somogyi-Nelson.

3.3.2 .Actividad glicosidasa

Los ensayos de actividad glicosidasa, empleando la técnica de difusión en placa, mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa en todas las cepas y actividad β -glucosidasa positiva en los cultivos de *A. terrícola*; *D. stemonitis*; *G. roseum*; *P. lilacinus* y *V. tenerum*. El hallazgo más importante, sin embargo, fue la presencia de actividad ramnosidasa de *V. tenerum*. a pH 9.5 en los tres medios del cultivo. De acuerdo a la información bibliográfica, esta sería la primera actividad ramnosidasa alcalina de origen microbiano que se describe. Debido a lo interesante de esta observación se decidió estudiar en mayor detalle dicha actividad producida por *V. tenerum*

Tal como se mencionó en la introducción, la actividad α -ramnosidasa medida con pnp-Ram indica una enzima diferente a la que libera ramnosa terminal del RG, pero con capacidad para hidrolizar los enlaces α -(1-2) y α -(1,6) entre ramnosa y glucosa de los flavonoides naringina y hesperidina. Es interesante destacar que estos flavonoides son poco solubles en medio ácido (pH 5.0-6.0), condición en la cual actúan la mayoría de las ramnosidasas estudiadas, siendo en este sentido altamente deseable una ramnosidasa alcalina que actúa en condiciones de alta solubilidad del sustrato. Por lo tanto, resultó importante verificar la actividad de la ramnosidasa con estos flavonoides en condiciones alcalinas. Otro aspecto importante a resolver fue la separación de la actividad ramnosidasa de la β -glucosidasa (que también está presente en los cultivos) ya que esta última libera glucosa del producto de hidrólisis de la ramnosidasa, interfiriendo de este modo en la reacción.

En base a estos objetivos, se decidió purificar la ramnosidasa y verificar la hidrólisis de naringina en medio alcalino.

Por otra parte y considerando que la enzima podría ser inducible, se realizaron cultivos en presencia de naringina como potencial inductor, empleando como fuente de carbono el jugo V-8. En estos cultivos se adicionó naringina (técnica) al medio en una concentración de 1.25 g /l. Para facilitar su incorporación, esta se disolvió primero en el buffer fosfato/carbonato, logrando una solución que se

esterilizó por filtración. A continuación, se reconstituyeron los medios, se impregnó la perlita y el cultivo se desarrolló durante 72 hs, siguiendo el mismo procedimiento de extracción que el realizado en los otros cultivos. Los resultados de la actividad ramnosidasa (cinética a 405 nm) en el extracto crudo mostraron valores de 0,83 y 2.83 mU/ml en ausencia y presencia de naringina respectivamente. Esto demuestra que la ramnosidasa alcalina de *V. tenerum* es inducible por naringina y que este a su vez es un sustrato potencial para la enzima.

En la tabla 3.5 se resumen los datos de la purificación y en la figura 3.3 se muestra un análisis de la purificación por SDS-PAGE.

Tabla 3.5: Resumen de la purificación parcial de la α -ramnosidasa alcalina de *V. tenerum*

	volumen (ml)	Actividad ramnosidasa total mU	Rendimiento (%)	Actividad β -glucosidasa total mU
Extracto	25	70.8	100	20.4
Extracto concentrado	2.5	67.1	95	15.7
PD-10	2.0	40.0	56	12.8
Sepharose Q	1.8	9.00	13	negligible
Liofilizado final	0.2	6.6	9.4	negligible
Liofilizado final + Ca⁺²	-	9.3	-	negligible

Los datos del proceso de purificación mostraron una pérdida significativa de actividad ramnosidasa, luego del pasaje del extracto concentrado por una columna PD-10 equilibrada con buffer Tris-HCl, 20 mM, pH 8.0, lo cual sugiere que en este paso se eliminan componentes presentes en el medio que estabilizan o activan la enzima. La cromatografía de intercambio aniónico mostró un solo pico de actividad ramnosidasa libre de β -glucosidasa (eluyó a menores concentraciones de NaCl), lo cual demostró que ambas actividades son llevadas a cabo por enzimas diferentes. Se puede inferir además que la actividad ramnosidasa es debida a una sola proteína enzimática o a enzimas con propiedades muy semejantes. La pérdida de actividad

durante la cromatografía en Sepharose Q fue también significativa, lo cual puede atribuirse a una excesiva dilución de la proteína o a procesos de desnaturalización que ocurren durante el proceso de adsorción a la matriz. La recuperación final de la actividad ramnosidasa luego de la purificación fue del 10 %. La actividad del producto final fue estimulada por calcio (ensayo con pnp-Ram en presencia de 1 mM de calcio) propiedad que también fue reportada para ramnosidasas no alcalinas. La purificación de la proteína en presencia de calcio como posible activador o estabilizador no se realizó. El análisis por SDS-PAGE mostró que el preparado enzimático final no es homogéneo ya que aparecen dos bandas principales de proteína y dos menores. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, este preparado resultó apropiado para determinar la capacidad de la ramnosidasa de hidrolizar flavonoides a pH 9.5.

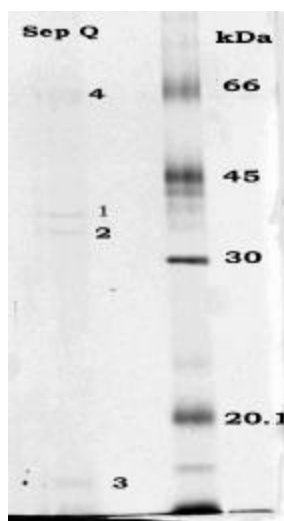


Figura 3.3: SDS-PAGE: Análisis del preparado purificado de α -ramnosidasa alcalina.

Línea izquierda (Seph Q): muestra de la cromatografía en Sepharose Q.1, 2, 3, 4 bandas de proteína

Línea derecha: patrones de proteína de bajo peso molecular (14.4 a 94 kDa)

3.3.3 Hidrólisis de naringina con α -ramnosidasa alcalina de *V. tenerum*.

3.3.3.1 Purificación del Sustrato:

Luego de recrystalizar la naringina y determinar su punto de fusión, se verificó la pureza del producto por medio de un análisis en TLC.

La figura 3.4 muestra los resultados obtenidos en dicho análisis.

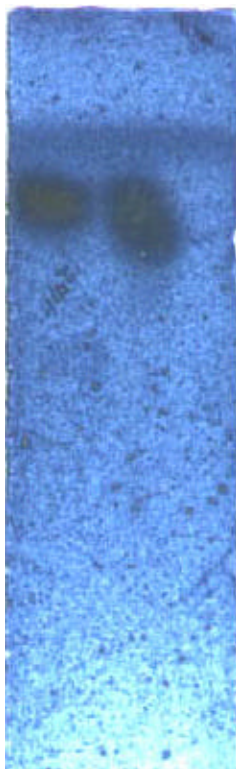


Fig. 3.4: TLC: Análisis de la purificación de Naringina.

calle izq: naringina recrystalizada 200 ug

calle der: naringina técnica 200 ug

3.3.3.2 Reacción de hidrólisis

Tal como se indicó anteriormente, los ensayos cinéticos con pnp-Ram mostraron un efecto activante del calcio, por lo tanto la hidrólisis de naringina se llevó a cabo en presencia de 1 mM de Ca^{+2} . La reacción se realizó a 37°C incubando 580 μl de sustrato con 10 μl de enzima (0.46 mU). El curso de la hidrólisis se evaluó

midiendo el incremento de poder reductor (Somogy-Nelson) como indicativo de la aparición de ramnosa libre. También se determinó la liberación de glucosa (Glicemia enzimática), como indicador de actividad β -glucosidasa. Las muestras se tomaron a intervalos de 60 minutos (tiempo total de incubación 180 min), deteniendo la reacción por calentamiento (1 min a 100 C). El esquema de la reacción se muestra en la Figura 3.5

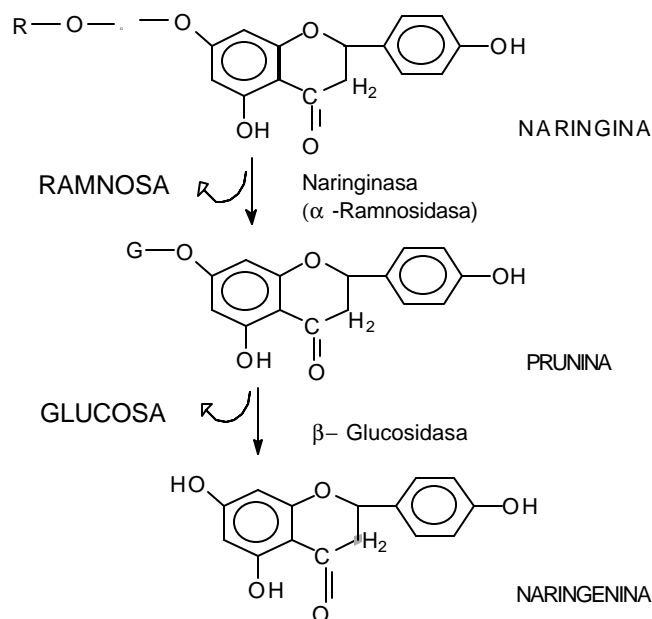


Figura 3.5 Hidrólisis de naringina por ramnosidasa

Los resultados obtenidos mostraron un incremento neto de azúcares reductores de 78 mg/l y ausencia de glucosa luego de 180 min de reacción. Estos valores indican un 24 % de hidrólisis del sustrato. Para confirmar la formación de ramnosa durante la hidrólisis, los productos de reacción se analizaron mediante TLC. En la figura 4.6 se muestra dicho análisis, donde se comprueba que el poder reductor generado en la reacción se debe a la liberación de ramnosa, y que el orden de su concentración se encuentra en el rango esperado. La pequeña mancha que se observa debajo de la naringina en la muestra hidrolizada, probablemente corresponda a la prunina, el otro producto de la reacción de hidrólisis. Este análisis fue confirmado

mediante HPTLC empleando las mismas condiciones de corrida (figura no mostrada).

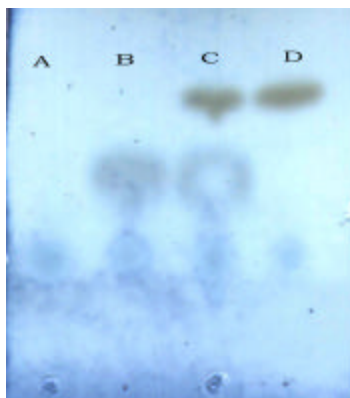


Figura 3.6: **TLC** análisis de la hidrólisis de naringina con ramnosidasa alcalina de *V. tenerum*.

Condiciones de reacción: naringina purificada 1.0 mg/ml en Tris-HCl 20 mM, pH 9.5 conteniendo 1 mM de Ca^{+2} . Ramnosidasa 0.46 mU, 3 hs incubación

TLC: solvente de desarrollo, acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (10:1.1:1.1:2.7 v/v/v/v). Revelador ácido fosfo molibdico.

A buffer Tris-HCl 20 mM pH 9.5 10 μl , B Ramnosa 2 μg en buffer, C. muestra hidrolizada 12 μl , D: sustrato sin hidrolizar 10 μg .

4 Conclusiones

- Los hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes, empleados en el presente trabajo para un screening de enzimas alcalinas, crecieron eficientemente en perlita impregnada con medio nutritivo bajo condiciones que simulan su ambiente natural alcalino.
- Todos los hongos metabolizaron glucosa y los azúcares simples presentes en un extracto vegetal, pero mostraron diferencias significativas en su capacidad para crecer en pectina. Esto demuestra que su perfil metabólico es heterogéneo.
- Los resultados del screening de enzimas mostraron que *V. tenerum* es una fuente importante de enzimas alcalinas, destacándose en particular la actividad frente a ramnogalacturonano y de una ramnosidasa activa frente a pnp-Ram a pH 9.0. Esta última se induce en presencia de naringina.
- La actividad ramnosidasa de *V. tenerum* fue parcialmente purificada a partir de un cultivo con extracto vegetal y naringina como inductor, obteniéndose un preparado enzimático libre de actividad β -glucosidasa. Los resultados del proceso de purificación sugieren que la actividad ramnosidasa es llevada a cabo por una sola proteína. El bajo rendimiento del proceso de purificación sugiere la presencia en el medio de cultivo de un factor estabilizante de la enzima. La enzima parcialmente purificada fue activada por calcio.
- La ramnosidasa alcalina de *V. tenerum* hidrolizó naringina a pH 9.5, lo que demostró su potencial catalítico para hidrolizar flavonoides en condiciones alcalinas. Este es el primer reporte de una ramnosidasa con esta propiedad.
- La ramnosidasa alcalina de *V. tenerum* es una enzima con posible aplicación tecnológica en procesos relacionados con la producción de ramnosa y la hidrólisis de sustratos sintéticos y naturales.

Referencias Bibliográficas

1. Alkorta,I., Garbisu,C., LLama,M.J. & Serra,J.L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biotechnology* **33**, 21-28 (1998).
2. Viikari L, Tenkanen M & Suurnäkki. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Rehm HJ* **10**, 523-546 (2001).
3. Cabello,M., Arambarri & A. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed Celtis tala and Scutia buxifolia forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiol. Res* **157**, 1-11 (2002).
4. Voragen,A.G., Beldman,G. & Schols,H.A. *Advanced Dietary Fibre Technology*. McCleary,B.V. & Prosky,L. (eds.), pp. 379-398 (Blackwell Science,2001).
5. Pirt,S.J. A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. *Journal of General Microbiology* **47**, 181-197 (1966).
6. Kashyap DR, Chandra S, Kaul A & Tewari R. *Production, purification and characterization of pectinase from a Bacillus sp. DT7*. *World J Microbiol Biotechnol* **16**, 277-282 (2000).
7. Kashyap DR, Vohra P & Soni SK. *Degumming of buel (Grewia optiva) bast fibers by pectinolytic enzyme from Bacillus sp. DT7*. *Biotechnol Lett* **23**, 1297-1301 (2001).
8. Dosanjh NS & Hoondal GS. Production of constitutive, thermostable, hyperactive exopectinase from Bacillus GK-8. *Biotechnol Lett* **18**, 1435-1438 (1996).
9. Kapoor M *et al.* Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from Bacillus sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (Boehmeria nivea) and sunn hemp (Crotalaria juncea) bast fibers. *Process Biochem* **36**, 803-807 (2001).
10. Blanco,P., Sierio,C. & Villa,T.G. Production of pectic enzymes in yeast. *FEMS Microbiology Letters* **175**, 1-9 (1999).
11. Huang LK & Mahoney RR. *Purification and characterization of an endopolygalacturonase from Verticillum alboatrum*. *JAppl Microbiol* **86**, 145-156 (1999).
12. Stratilova E, Breierova E & Vadkertiova R. Effect of cultivation and storage pH on the production of multiple forms of polygalacturonase by Aspergillus niger. *Biotechnol Lett* **18**, 41-44 (1996).
13. Cao J, Vaal,J.F.A. & Chen S. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme Microb Technol* **14**, 1013-1016 (1992).
14. Voragen,A.G., Pilnik W., Thibault,J.F., Axelos,M.A. & Renard,C. Food polysaccharides and their applications. Stephen,A.M. (ed.), pp. 287-339 (Marcel Dekker, New York,1995).
15. Fogarty,W. & Kelly,C.T. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Fogarty,W. (ed.),

- pp. 131-182 (Applied Science, New York, 1983).
16. Heinrichova, K. & Wojciechowicz, M. The pectinolytic enzyme of *Selenomonas rumiantum*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 169-174 (1989).
 17. Finkelman, M.J. & Zajic, J.E. Pectinase from *Aureobasidium pullulans*. *Developments in Industrial Microbiology* **19**, 459-464 (1978).
 18. Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P. & Delmer, D.P. The primary cell walls of flowering plants, the biochemistry of plants. Academic press, New York (1980).
 19. Dey, P.M. & Brinson, K. Plant cell wall. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* **42**, 265 (1984).
 20. Pickersgill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W. & Robert-Baudouy, J. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural Biology* **1**, 717-723 (1994).
 21. Mayans, O. *et al.* Two crystal structures of pectin lyase a from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in substrate binding cleft of pectin and pectate lyase. *Structure* **5**, 677-689 (1997).
 22. Lyon, G.D., Smith, K.J. & Heilbronn, J. The calcium requirement of polygalacturonic acid lyases produced by *Erwinia spp.* *Letters in Applied Microbiology* **2**, 127-129 (1986).
 23. Moran, F., Nasuno, S. & Starr, M.P. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminases of *Erwinia carotovora*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **123**, 298-306 (1968).
 24. Shevchik, V.E. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular microbiology* **24**, 1285-1301 (1997).
 25. Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, E.J. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* **39**, 213-294 (1993).
 26. Beldman, G. *et al.* Progress in Biotechnology 14: Pectins and Pectinases. Visser, J. & Voragen, A.G. (eds.), pp. 231-245 (Elsevier, Amsterdam, 1996).
 27. Hayashi K *et al.* Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF03-01173. *Phytochemistry* **45**, 1359-1363 (1997).
 28. Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. & Beg, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 409-418 (2002).
 29. Yu, X., Hallett, S.G., Sheppard, J. & Watson, A.K. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 301-305 (1997).
 30. Contreras Esquivel, J.C., Hours, R.A., Voget, C.E. & Mignone, C.F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**, 48-52 (1999).

31. Blumenkrantz,N. & Asboe-Hansen,G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **54**, 484-489 (1973).
32. Dubois,M., Gilles,K.A., Hamilton,J., Krobers,P.A. & Smith,F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356 (1956).
33. Lowry O.H, Rosebrough,N.J., Farr,A.L. & Randall,R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* **193**, 265-275 (1951).
34. Albersheim,P. Pectin lyase from fungi. *Methods in enzymology* **8**, 628-631 (1966).
35. Somogyi,N. Notes on sugar determination. *Journal Biological Chemistry* 195, 19-23. 1952. Ref Type: Abstract
36. Nelson,N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 376-380 (1944).
37. Smith B.J. *Methods in Molecular Biology*. Walker JM,E. (ed.), pp. 41-56 Clifton, New Jersey: ,1984).
38. Blum,H., H.Beier & H.J.Gross. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99 (1987).
39. Lojkowska E, Masclaux C, Boccara M, Robert-Baudouy J & Hugouvieux-Cotte-Pattat N. Characterization of the pelL gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol* **16**, 1183-1195 (1995).
40. Trinci A.P.J. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology* **57**, 11-24 (1969).
41. Aeberhard,R. *et al. Determinación de las isotermas de sorción de materiales constructivos porosos e higroscópicos (madera)* . Grupo de Investigación de Energías Renovables (GIDER) - Departamento de Termodinámica.Facultad de Ingeniería - UNNE. 2000. Ref Type: Unpublished Work
42. Badui Dergal Salvador. Ed.Pearson (ed.), pp. **1.7-1.10**1998).